

ABSTRACT  
JP 5-302895

\*\*\* PATENT GROUP \*\*\*

-4- (WPAT)

ACCESSION NUMBER 93-400792/50

SECONDARY ACCESSION C93-178442

XRPX N93-310110

TITLE Chemiluminescent detection process for e.g. amine  
cpds. - by supplying complex transition metal and  
bi:pyridine cpd. to column filled with oxidising  
agent

DERWENT CLASSES J04 S03

PATENT ASSIGNEE (UCHI/) UCHIKURA K

NUMBER OF PATENTS 1

NUMBER OF COUNTRIES 1

PATENT FAMILY JP05302895-A 93.11.16 (9350) 6p G01N-021/76

PRIORITY 92.04.27 92JP-134177

APPLICATION DETAILS 92.04.27 92JP-134177

ABSTRACT (JP05302895-A)

Complex of a transition metal and bipyridine is supplied to a column (in which an oxidising agent is filled) and oxidised to increase oxidn. number of the transition metal element in the complex. It is then contacted with a sample to detect the presence of the chemiluminescence causing substance in the sample.

Detection appts. comprises a column in which an oxidising agent is filled, which is used to increase the oxidn. number of the transition metal element by oxidising the complex of the transition metal with bipyridine, a reagent pumping device to supply a soln. of the complex of the transition metal with bipyridine through the oxidising agent column to the mixing member, a sample pumping device to supply the sample soln. to the mixing member, and a luminescence detecting member to detect the chemiluminescence caused in the mixing member.

USE/ADVANTAGE - Amines etc., can be simply detected and no high levels of skills are required different from the case with the electrolytic chemical luminescence using an electrolytic cell. The appts. and the compsn. can be simplified. Maintenance becomes easy. (Dwg. 0/5)

AN

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-302895

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 21/76

識別記号

庁内整理番号

7906-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-134177

(22)出願日 平成4年(1992)4月27日

(71)出願人 591099072

内倉 和雄

神奈川県横浜市港南区野庭町194番地

(72)発明者 内倉 和雄

神奈川県横浜市港南区野庭町194番地

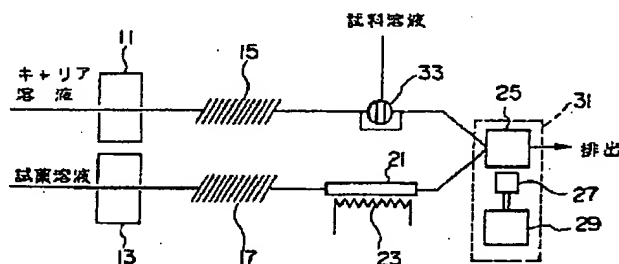
(74)代理人 弁理士 白村 文男

(54)【発明の名称】 化学発光を利用した検出方法および検出装置

(57)【要約】

【構成】 キャリア溶液がポンプ11により混合容器25に送られ、アミン、ケトン、ケト酸等を含む試料溶液がインジェクタ33で注入される。一方、Ru、Cr等の遷移金属とビピリジンとの錯体を含む試薬溶液がポンプ13により送られ、PbO<sub>2</sub>等を充填した酸化剤カラム21で酸化され、遷移金属の価数が増加し、混合容器25で試料中のアミン等と反応して発光する。この発光を、フォトカウンタ等の発光検知部材27で検知し、アミン等の存在を確認する。

【効果】 酸化剤カラムを用いるだけで簡単にアミン等を検出でき、電解セルを用いる電解化学発光の場合のように操作に高度の熟練度が要求されない。装置構成を簡略化でき、保守も簡単である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸化剤を充填したカラムに、遷移金属とビピリジンとの錯体を供給し、酸化剤により酸化して錯体中の遷移金属元素の酸価数を増加せしめ、ついで、この酸化体と被検試料を接触させて化学発光せしめることにより、被検試料中の化学発光原因物質の存在を検出することを特徴とする化学発光を利用した検出方法。

【請求項2】 遷移金属とビピリジンとの錯体を酸化して遷移金属元素の酸価数を増加せしめる酸化剤が充填された酸化剤カラムと、

遷移金属とビピリジンとの錯体溶液を、酸化剤カラムを通して混合部材に供給する試薬ポンプ装置と、被検試料溶液を混合部材に供給する試料ポンプ装置と、混合部材中での発光を検出する発光検出部材とを具えたことを特徴とする化学発光を利用した検出装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遷移金属とビピリジンとの錯体の化学発光を利用して、種々の化合物の存在を検出する検出方法および装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】最近、発光反応に基づく分析法が、吸光度法や蛍光法に比較して高感度であり、定量範囲の広さ、発光反応時間の短さによる応答速度の速さ等によって流通系における検出手段として注目され、新しい高感度検出法として広範な化合物に適用されている。また、近年、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）や連続流れ分析法（FIA: Flow Injection Analysis）に容易に適用できる化学発光検出器が開発、市販されるに至って、種々の測定に利用されている。

【0003】発光には、化学発光、生物発光などに基づくものがあるが、現在、分析法としては、化学発光（chemiluminescence, CL）を利用したものが多く、アシルヒドラジド類（ルミノール、イソルミノール）、アクリジニウム塩、エステル（ルシゲニン、N-メチルアクリジン）、シュウ酸エステル（TCPO）等が発光物質として知られている。

【0004】一方、電解で生成したイオン種（活性種）の反応によって発光する電解化学発光（electro generated chemiluminescence, ECL）系は選択性、特異性に優れているが、日常の分析法として利用されているものはほとんどなかった。

【0005】本発明者は先に、遷移金属とビピリジンとの錯体の電解化学発光に着目し、種々の物質をスクリーニングした結果、脂環式第三級アミン、インドール（特願平3-108424号）およびケトン、ケト酸（特願平3-242554号）などが高い選択性で高感度に検出していることを見出した。また、一級アミン、二級ア

ミン、脂環式第二級アミンも、三級アミンに変換したのち同様に検出できる。

【0006】一級アミン、二級アミン、脂環式第三級アミン、インドール等の含窒素有機化合物には、アミノ酸、カテコールアミン、ポリアミン、アルカロイド、抗生物質、医薬品、トリアトファンの代謝産物であるインドールアミンなど生理活性を示すものが多数存在し、生物化学、植物化学等の広い分野で興味をもたれている化合物群である。

10 【0007】また、ケトンおよびケト酸は、一般試薬や工業化学品および中間体としての利用に加え、生体の代謝疾患の指標として用いられるなど、広く利用されている化合物群である。例えば、酵素欠損による生理的異常代謝の結果、アセトン、アセト酢酸、β-オキシ酪酸等のいわゆるケトン体が血液、尿中に蓄積する先天性代謝異常において、これを検出することにより、早期発見、検査、治療に役立てることができる。

20 【0008】しかしながら、電解化学発光を利用するときには、電解セルが必要となり、また、その作動および保守には専門的な知識や経験が必要なため、必ずしも簡便な分析法と言えない場合があり、特に医療機関や一般の分析センターにおいては取り扱いが面倒なときもある。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高い選択性を示して高感度に発光する遷移金属／ビピリジン錯体の化学発光を利用し、簡便な装置および操作で、発光原因物質を検出することを目的とする。

## 【0010】

30 【課題を解決するための手段】本発明の化学発光を利用した検出方法は、酸化剤を充填したカラムに、遷移金属とビピリジンとの錯体を供給し、酸化剤により酸化して錯体中の遷移金属元素の酸価数を増加せしめ、ついで、この酸化体と被検試料を接触させて化学発光せしめることにより、被検試料中の化学発光原因物質の存在を検出することを特徴とする。

40 【0011】本発明の化学発光を利用した検出装置は、遷移金属とビピリジンとの錯体を酸化して遷移金属元素の酸価数を増加せしめる酸化剤が充填された酸化剤カラムと、遷移金属とビピリジンとの錯体溶液を、酸化剤カラムを通して混合部材に供給する試薬ポンプ装置と、被検試料溶液を混合部材に供給する試料ポンプ装置と、混合部材中での発光を検出する発光検出部材とを具えたことを特徴とする。

## 【0012】

【発明の実施態様】図1は、本発明の検出方法を実施するための装置の一例を示す説明図である。遷移金属のビピリジン錯体を含む試薬溶液は、ポンプ13（試薬ポンプ装置）によりダンパチューブ17を経て、酸化剤カラム21に供給されて酸化され、混合容器25（混合部

材)に連続的に注送される。23はヒータを示し、酸化剤カラム21を適当な温度に加熱し、あるいは一定にする。

【0013】一方、キャリア溶液は、ポンプ11(試料ポンプ装置)によりダンパチューブ15を介して混合容器25に連続的に供給され、この経路の途中でインジェクタ33により被検試料溶液が注入され、試薬溶液と混合されて発光を示す。

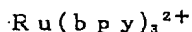
【0014】なお、ダンパチューブ15、17は、長い細管(例えば20m程度)からなり、ポンプ11、13の脈動を吸収して、滑らかに連続的に試薬溶液およびキャリア溶液を後段に供給するためのものである。

【0015】本発明で検出用試薬として用いられる遷移金属とビピリジンとの錯体における遷移金属としては、ルテニウム(Ru)、クロム(Cr)、コバルト(Co)、ロジウム(Rh)、オスミウム(Os)などが挙げられる。特にルテニウムまたはオスミウムとビピリジンとの錯体が好ましい。

【0016】この遷移金属とビピリジンとの錯体の発光機構について、一例としてトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体(以下、化1の如く示す)と脂環式第三級アミンとの場合を取り上げて示す。

【0017】

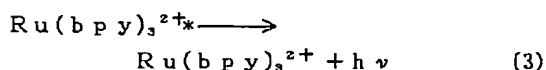
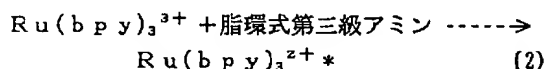
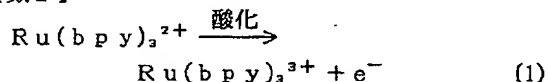
【化1】



【0018】ルテニウムが2価の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体は、下記数1に示したように酸化されてルテニウムが3価の $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 錯体となり(1)、これが脂環式第三級アミンにより還元され、励起状態の2価錯体(\*で表示)(2)を経て基底状態の2価錯体となるとときに30 発光する(3)ものと考えられる。

【0019】

【数1】



【0020】ここで発光のためには、励起状態の錯体を生成することが重要であり、錯体と反応性を示す還元性物質、無機塩等でも励起状態を生じえないものは発光を示さないため、本発明の検出方法は高い選択性を示す。

【0021】酸化カラム21には、遷移金属/ビピリジン錯体を酸化する酸化剤が充填されている。この酸化剤 50

としては、金属酸化物、例えば二酸化鉛( $\text{PbO}_2$ )、酸化ビスマス( $\text{Bi}_2\text{O}_4$ )、酸化金( $\text{Au}_2\text{O}_3$ )などが用いられる。金属酸化物の粒度は広い範囲で選択でき、また純度の影響も少なく、例えば市販の $\text{PbO}_2$ 粉体をそのまま用いても、後記の実施例においてカラムの目詰りがなく、10日以上連続運転が可能であった。

【0022】混合容器25内での発光は、光電子増倍管、アバランシェフォトダイオード、イメージインテンシファイア等を用いた発光検出部材27により検出され、記録計29に出力、記録される。31は、検出器ユニットを示す。

【0023】ビピリジン錯体の酸化体は、含水溶媒中で不安定なので、遷移金属のビピリジン錯体を含む溶液を連続的に酸化剤カラム21に供給し、得られた酸化体をすみやかに連続的に混合容器25に供給して試料溶液と反応せしめることが好ましい。

【0024】図2は、分離系と組み合わせる本発明を実施する場合の装置の一例を示す説明図であり、分離系としてHPLCを用いている。

【0025】インジェクタ33から一定量の試料溶液がHPLCのカラム35に注入され、ついで、ポンプ41により溶離液(移動相溶媒)をカラム35に送液する。試料溶液中の混合物試料は各成分に分離され、溶離液(キャリア溶液)に運ばれて混合容器25に供給される。

【0026】これにより、血液、尿等の混合物中の検査対象物質、例えば一級アミン、二級アミン、脂環式第三級アミン、インドール化合物、ケトン、ケト酸などを、それぞれの成分に分離して検出することができる。

【0027】本発明で検査対象となる物質としては、一級アミン、二級アミン、脂環式第三級アミン、インドール化合物、ケトン、ケト酸が挙げられるが、スクリーニングにより、いっそう多くの検査対象物質の発見が期待される。

【0028】一級アミンおよび二級アミンの具体例としては、アルキルアミン、アミノ酸、カテコールアミン、ポリアミンなどがある。

【0029】脂環式第三級アミンの具体例としては、構造の簡単なアミンの他、生体物質、アルカロイド、抗生物質、医薬品などがあり、例えば、(還元型)ニコチン酸アミド-アデニンジヌクレオチド、アトロピン(Atropine)、トロピン(Tropine)、ホマトロピン(Homatropine)、スコボラミン(Scopolamine)、ニコチン(Nicotine)、ブルシン(Brucine)、シンコニジン(Cinchonidine)、シンコニン(Cinconine)、キニジン(Quinidine)、スパルテイン(Sparteine)、エメチン(Emetine)、ストリキニン(Strychnine)、ヨヒンビン(Yohimbine)、ソラニジン(Solan 50

idine)、アコニチン(Aconitine)、アレコリン(Arecoline)、エルゴタミン(Ergotamine)、フィソスチグミン(Physostigmine)、リンコマイシン(Lincosamin)、マイトマイシン(Mitomycin)、エリスロマイシン(Erythromycin)、ペニシリンG(Penicilline G)、セファロチン(Cephalothine)、キノクリドール(Quinclidol)、ジフェニドール(Diphenidol)、コチニン(Cotinine)、N-エチルモルホリン、N-メチルピロリジン、N-エチルピペリジンなどがある。

【0030】インドール化合物としては、インドールの他にその各種置換体があり、例えばインドール核の3位が-CHO、-OCOCH<sub>3</sub>、-COOH、-CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>COCOOH、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>CH(OH)COOH、CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>で置換された誘導体が挙げられる。

【0031】ケトンの具体例としては、例えば、2-ペンタノン、3-ペンタノン、2-ヘキサノン、3-ヘキサノン、2,3-ペンタンジオン、2,4-ペンタンジオン、3,4-ヘキサジオン、2,5-ヘキサジオン、1,3-シクロペンタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、1,3-シクロヘキサジオン、1,4-シクロヘキサジオン、テトラヒドロチオフェン-3-オン、テトラヒドロチオピラン-4-オン、テトラヒドロ-4H-ピラン-4-オン、5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサジオン、2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-4,6-ジオン、アセトフェノン、ケトステロイドなどが挙げられる。

【0032】また、ケト酸(ケトン酸)としては、 $\alpha$ -ケト酸、 $\beta$ -ケト酸、 $\gamma$ -ケト酸などがいずれも検出可能であり、例えば、ピルビン酸、2-ケト-n-酪酸、3-ケト-n-酪酸、2-ケト-i-バレリアン酸、2-ケト-3-メチル-n-バレリアン酸、2-ケト-i-カプロン酸、オキサリ酢酸、2-ケトグルタル酸、3-ケトグルタル酸、2-ケトグルコン酸などが挙げられる。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、酸化剤カラムを通して遷移金属/ピペリジン錯体を酸化することにより、簡単な装置構成で、しかも簡便に化学発光を利用して脂環式第三級アミン等を検出することができ、電解セルを用いる場合のように特別な知識や経験を必要としない。

【0034】また、連続使用により酸化剤カラムが疲弊した際は、カートリッジのようにこれを交換すれば足りるので、保守管理も簡単である。脂環式第三級アミン、インドール化合物、ケトン、ケト酸は、高い選択性でピコモル以下の感度で検出できるので、本発明の適用に有

利である。

【0035】

【実施例】

実施例1

図1に示した装置を用いて、酸化剤カラムによるRu(bpy)<sub>3</sub>イオン(+2価)の酸化についての条件の影響について検討した。以下の実施例では、特に断りのない限り、以下の条件および装置を用いて行なった。

【0036】キャリア溶液: 10mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10%アセトニトリル水溶液を、1.0ml/minで供給

試薬溶液: 10mM-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.03mM-Ru(bpy)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>水溶液を、0.3ml/minで供給

【0037】酸化剤カラム21: 内径5mm×長さ50mmのカラムに、市販PbO<sub>2</sub>粉末を充填  
検出器ユニット31: 日本電子(株)製、LC30-DPC10を使用

【0038】(1) カラム温度の影響について  
ヒータ23として水浴を用いこれに酸化剤カラム21を浸し、20~60℃の温度範囲でRu(bpy)<sub>3</sub>イオン(+3価)の生成率の影響について調べたところ、図3の結果が得られた。

【0039】図3から、温度に伴ってRu(bpy)<sub>3</sub>イオン(+3価)の生成率が上昇し、50~60℃でほぼ一定となることが判る。このときのRu(bpy)<sub>3</sub>イオン(+2価)からRu(bpy)<sub>2</sub>イオン(+3価)への変換率はほぼ100%である。

【0040】(2) 試薬溶液のpHの影響について  
Ru(bpy)<sub>3</sub>イオン(+2価)を10mM-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液(pH=2.0)に溶解したときの変換率を100%とすると、10mM-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(pH=2.5)のときは約75%、10mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(pH=4.6)のときは約15%であった。

【0041】(3) 酸化剤カラム21のカラムサイズの影響について

内径5mm×長さ50mmのカラムに代えて、内径5mm×長さ100mmまたは内径3mm×長さ100mmのカラムを使用した。Ru(bpy)<sub>3</sub>イオン(+3価)の生成率に差は認められなかった。

【0042】(4) 酸化剤カラム21と検出器ユニット31との間の流路について

酸化剤カラムによって変換されたRu(bpy)<sub>3</sub>イオン(+3価)は、不安定のため速やかに検出器ユニット31に送り込まなければならない。例えば、51.6秒後には、はじめの33%が+2価のイオンに戻ってしまうので、20秒以内に検出器ユニット31に送り込むことが望ましい。

【0043】このためには、ポンプ11の性能にもよるが、内径0.25mm、長さ1m程度か、それ以下のチューブで、酸化剤カラム21と検出器ユニット31(混

合容器25)を連結することが好ましい。

#### 【0044】実施例2

下記表2の3種類の物質の発光強度(図1の装置:FIA流路系)を用いて調べた。検出条件は、実施例1の標準条件に拠った。

【0045】3者とも強く発光し、それぞれの検出限界は、ピコモル、あるいはそれ以下の30フェムトルと非常に高感度であり、これは電解化学発光法によるものと\*

化 合 物	発光強度	検出限界
インドキシル硫酸	11	2.3 ピコモル
還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド	879	0.03ピコモル
レートリプトファン	100	0.25ピコモル

#### 【0048】実施例3

図2に示した装置を用い、アミノ酸であるバリンのジビニルスルホン誘導体を分離検出した例を図4に示す。クロマトグラムは40 pmol注入したものを示し、分離カラムとしてはシリカODS充填カラム(L-Column, 化学検査品協会, 内径4.6mm, 長さ150mm)を用いた。また、溶離液にはキャリア溶液を用いた。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施に用いられる装置の一例を示す説明図である。

【図2】本発明の実施に用いられる装置の一例を示す説明図である。

【図3】カラム温度と  $R_{\text{H}}(\text{hpy})_3$  イオン(3価)の生成率との関係を示すグラフである。

【図4】NADHを3.6ピコモルずつ3回繰り返して注入した場合のFIA検出チャートである。

※30

\*ほぼ等しい値であった。なお、発光強度は、発光量をホトカウンタ(発光検出部材27)で測定し、レートリプトファンを100とした値で示した。

【0046】また、還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド(NADH)を3.6 pmolずつ3回繰り返して流入したときの検出チャートを図4に示した。

【0047】

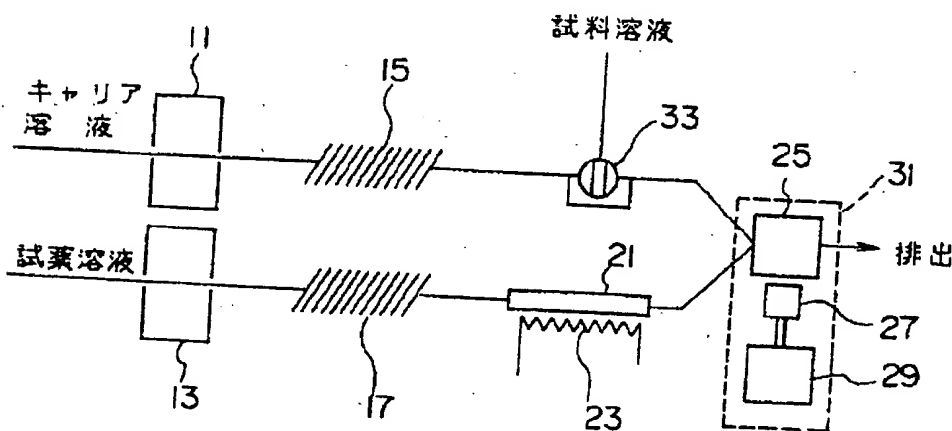
【表1】

※【図5】バリンのジビニルスルホン誘導体をHPLCと組み合わせて検出した場合のクロマトグラム(検出チャート)である。

#### 【符号の説明】

- 11 ポンプ
- 13 ポンプ
- 15, 17 ダンパチューブ
- 21 酸化剤カラム
- 23 ヒータ
- 25 混合容器
- 27 発光検知部材
- 29 記録計
- 31 検出器ユニット
- 33 インジェクタ
- 35 HPLCカラム
- 41 ポンプ(試料ポンプ)

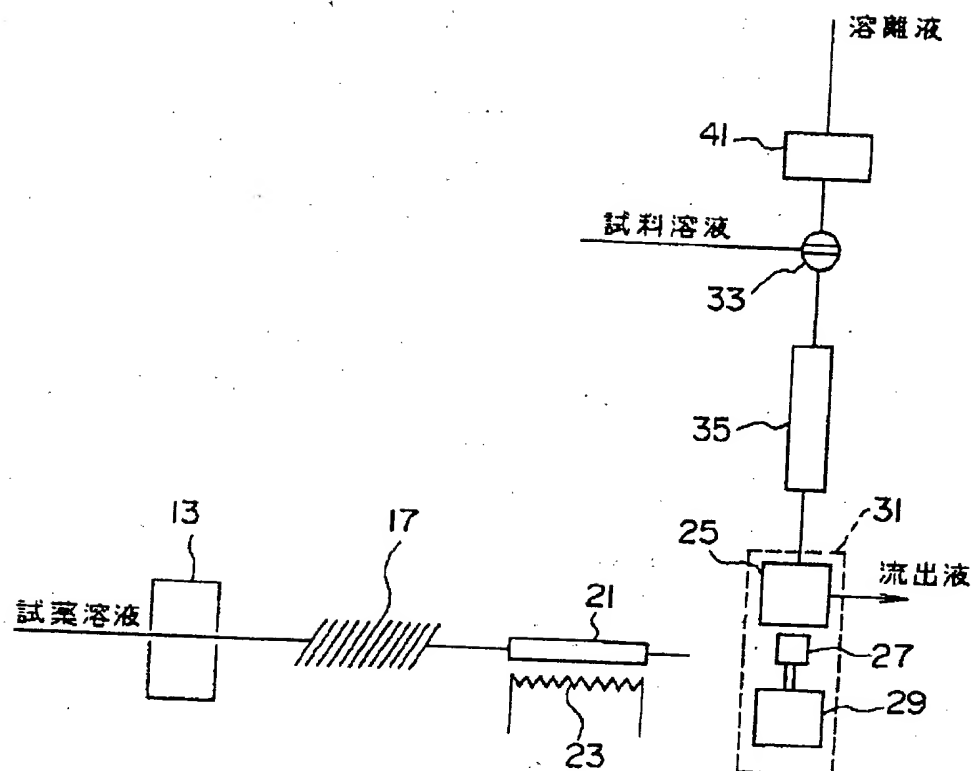
【図1】



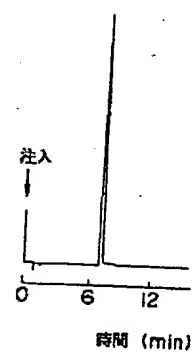
【図4】



【図2】



【図5】



【図3】

